

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09274041
PUBLICATION DATE : 21-10-97

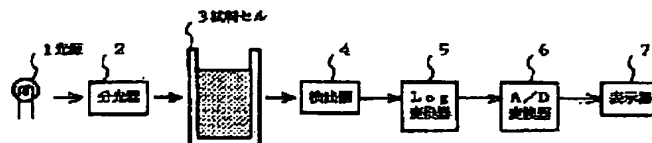
APPLICATION DATE : 07-02-97
APPLICATION NUMBER : 09024753

APPLICANT : NIPPON KODEN CORP;

INVENTOR : SHIMIZU KAZUYA;

INT.CL. : G01N 33/543 G01N 33/543 G01N
33/543 G01N 21/59 G01N 33/53

TITLE : METHOD AND APPARATUS FOR
MEASURING ANTIGEN-ANTIBODY
REACTION MATERIAL



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To measure the concentration of the antigen-antibody reaction material in the blood without the centrifugation of blood.

SOLUTION: Collected blood is contained in a sample cell 3, surface active agent is injected into the cell, furthermore, stabilizing agent and buffer solution are injected and stirred, and furthermore, sensitive latex liquid, which generates the antigen-antibody reaction for material to be measured is injected. Then, stirring is performed. The changing amount of the absorbance between two time points is obtained based on the amount of the absorbance in the liquid in the sample cell at the time immediately after the injection and amount of the absorbance at the time point after the elapse of the specified time from that time. Thus, the concentration in the blood to be measured described above is obtained.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-274041

(43) 公開日 平成9年(1997)10月21日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 8 3		G 0 1 N 33/543	5 8 3
	5 8 1			5 8 1 H
	5 8 7			5 8 7
21/59			21/59	Z
33/53			33/53	X
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 8 頁)				

(21) 出願番号 特願平9-24753

(22) 出願日 平成9年(1997)2月7日

(31) 優先権主張番号 特願平8-24110

(32) 優先日 平8(1996)2月9日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000230962

日本光電工業株式会社

東京都新宿区西落合1丁目31番4号

(72) 発明者 清水 一哉

東京都新宿区西落合1丁目31番4号 日本

光電富岡株式会社内

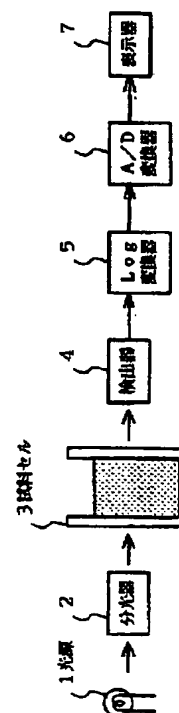
(74) 代理人 弁理士 本田 崇

(54) 【発明の名称】 抗原抗体反応物質の測定方法および測定装置

(57) 【要約】

【課題】 血液を遠心分離することなくその血液中の抗原抗体反応物質の濃度を、測定すること。

【解決手段】 採取した血液を試料セルに収容し、これに界面活性剤を注入して攪拌し、さらに安定化剤、緩衝液を注入して攪拌し、さらに測定すべき物質に対し抗原抗体反応を生じさせる感作ラテックス液を注入して攪拌し、この直後の時点の試料セル内の液体の透過光量と、この時点から所定時間経過後の時点の透過光量とに基づいて2時点間の吸光度の変化分を求め、これにより上記測定すべき物質の血中濃度を求める。



【特許請求の範囲】

【請求項1】採取した血液中の所定の抗原または抗体の濃度を測定する抗原抗体反応物質の測定方法において、採取した血液に界面活性剤を注入して攪拌し、この液体に安定化剤、緩衝液、前記所定の抗原または抗体に対する抗体または抗原が感作されたラテックス液を注入して攪拌した後、この液体に光を照射し、その透過光量に基づいて前記血液中の前記所定の抗原または抗体の濃度を測定することを特徴とする抗原抗体反応物質の測定方法。

【請求項2】所定の抗原はC反応性蛋白であることを特徴とする請求項1に記載の抗原抗体反応物質の測定方法。

【請求項3】採取した血液中の所定の抗原または抗体の濃度を測定する抗原抗体反応物質の測定装置において、採取した血液を収容する容器と、この容器中の血液に界面活性剤、安定化剤、緩衝液、前記所定の抗原または抗体に対する抗体または抗原が感作されたラテックス液のそれぞれを注入する注入手段と、前記容器中の液体を攪拌する攪拌手段と、前記容器中の液体に光を照射する光照射手段と、この光照射手段による光のうちその液体を透過した透過光量を検出する透過光量検出手段と、この透過光量検出手段が検出した光に基づいて前記血液中の前記所定の抗原または抗体の濃度を求める濃度測定手段とを具備することを特徴とする抗原抗体反応物質の測定装置。

【請求項4】所定の抗原はC反応性蛋白であることを特徴とする請求項3に記載の抗原抗体反応物質の測定装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、血液中のC反応性蛋白（C-Reactive Protein；以下CRPと称する）、リウマチ因子（RF）、抗ストレプトリジンO（ASO）等、抗原抗体反応を生じる物質を測定する方法および測定する装置に関する。

【0002】

【従来の技術】この種の物質の測定方法として、ラテックス凝集免疫比濁法がある。この方法に関して特開昭53-62826号には一般的に抗原抗体反応（免疫反応）が生じる物質の測定方法について開示されており、特開昭53-86015号にはCRPの測定方法について開示されており、特開昭62-218866号にはCRPの測定に用いる試薬について開示されている。このラテックス凝集免疫比濁法によれば、抗原抗体反応を生じる物質の濃度を定量的に精度良く測定することができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、この方法では、採取した血液（全血）をそのまま用いると、赤血球

やヘモグロビン等の影響を受け、正確な定量測定を行うことができない。このため、従来の生化学検査では上述のように採取した血液を遠心分離して血清を取り、この血清を用いて測定を行っていた。このため測定時間が長くなり、緊急の場合や遠心分離器の無い施設では測定は困難であった。一方、採取した血液の血液成分（赤血球数や白血球数）を調べるには、血液に抗凝固剤を添加した血漿を用いて検査しなければならず、そのため採取した血液を生化学検査用と血液成分検査用に分離して処理しなければならないなど大変手間がかかっていた。

【0004】本発明はこのような従来の欠点を鑑みなされたもので、その目的は、採取した血液を遠心分離することなく、かつ血液成分検査に用いるのと同じ検体を用いてその血液中の抗原抗体反応を生じる物質の濃度を測定することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】請求項1の発明は、採取した血液中の所定の抗原または抗体の濃度を測定する抗原抗体反応物質の測定方法において、採取した血液に界面活性剤を注入して攪拌し、この液体に安定化剤、緩衝液、前記所定の抗原または抗体に対する抗体または抗原が感作されたラテックス液を注入して攪拌した後、この液体に光を照射し、その透過光量に基づいて前記血液中の前記所定の抗原または抗体の濃度を測定することを特徴とする。

【0006】請求項2の発明は、請求項1の発明において、所定の抗原はC反応性蛋白であることを特徴とする。

【0007】請求項3の発明は、採取した血液中の所定の抗原または抗体の濃度を測定する抗原抗体反応物質の測定装置において、採取した血液を収容する容器と、この容器中の血液に界面活性剤、安定化剤、緩衝液、前記所定の抗原または抗体に対する抗体または抗原が感作されたラテックス液のそれぞれを注入する注入手段と、前記容器中の液体を攪拌する攪拌手段と、前記容器中の液体に光を照射する光照射手段と、この光照射手段による光のうちその液体を透過した透過光量を検出する透過光量検出手段と、この透過光量検出手段が検出した光に基づいて前記血液中の前記所定の抗原または抗体の濃度を求める濃度測定手段とを具備することを特徴とする。

【0008】請求項4の発明は、請求項3の発明において、所定の抗原はC反応性蛋白であることを特徴とする。

【0009】

【発明の実施の形態】図1は、この測定方法に用いる分光光度計を示している。この装置を説明すると、光源1の光は、分光器2で分光されこのうちヘモグロビン等に対して吸収が極めて少ない波長の光が試料セル3に照射されるように設定されている。試料セル3は、透明の部材で作成されており、この試料セル3を透過した光は、

検出器4で電気信号に変換される。この検出器4の出力はLog変換器5に至り、ここで対数変換され、次にA/D変換器6に至り、ここでデジタル値に変換され、表示器7にてその値が表示される。

【0010】本実施の形態では抗原抗体反応を生じるある物質Xの血液中濃度を測定する方法について説明する。

【0011】まず検査者は、試料セル3に、採取した血液と界面活性剤とを混合、攪拌したものを収容する。この界面活性剤によって血液は溶血する。すなわちここで赤血球の中に含まれているヘモグロビンが溶出する。

【0012】次に検査者は、試料セル3に安定化剤、緩衝液を注入して攪拌する。そして検査者はブランク測定を行う。すなわち検査者は抗原抗体反応を生じさせる前のこの試料セル3中の液体に分光器2からの光を吸収させ、表示器7の表示が所定値を示し安定しているかを確認する。

【0013】検査者は、上記表示が安定していることを確認すると、物質Xに対して抗原抗体反応を生じさせる感作ラテックス液を試料セル3に注入して攪拌する。

【0014】このときバラバラに分散した感作ラテックス（抗体あるいは抗原を結合させたラテックス）は抗原抗体反応により凝集し、見かけ上の粒径が増大する。凝集反応の進行に伴い、凝集塊が生長して見かけ上の粒径が増大すれば、その透過光量が減少する。このようなラテックス凝集反応による粒径増大の程度は、検体中に含まれる抗原または抗体の濃度により決まる。従って透過光量は検体中に含まれる抗原または抗体の濃度に依存する（検査と技術、vol.12,no.7,1984年7月、第583頁右欄最下行～第584頁左欄第34行参照）。

【0015】次に検査者はこの試料セル3に分光器2からの光を透過させ、直ちに表示器7の表示を読み取り、さ

$$(\text{補正後の}\Delta A) = \Delta A \times \{100 / (100 - \text{HCT})\} \dots (1)$$

このようにすればより正確に物質Xの濃度を求めることができる。

【0020】上記の方法を用いて血液中のCRP濃度を求める場合に、好適な結果が得られる。試薬、分量、光波長を以下に記す。

【0021】試薬

(1) 検量線作成用標準液：エルビアエースCRP標準品 0, 1.5, 3.5, 7.0, 14.0 mg/dl（ダイアヤトロン社製、商品名）

(2) ラテックス液、安定化剤：エルビアエースCRP-L（キット）（ダイアヤトロン社製、商品名）

ラテックス液：抗ヒトCRP感作ラテックス

安定化剤：ウシ血清アルブミン含有トリス-HClバッファ

(3) 緩衝液：共通バッファ、0.9%NaCl含有緩衝液

(4) 界面活性剤：ラウリル硫酸ナトリウム〔アニオン性(-)界面活性剤〕

らにこの時点aから所定時間t1経過後の時点bにおいて、表示器7の表示を読み取り、それぞれの値を記録する。これにより各時点における透過光量Ita, Itbの対数値LogIta, LogItbが得られる。

【0016】吸光度Aは一般に入射光量をIo、透過光量をItとすると、 $A = \text{Log}(Io/It)$ で表されるから、透過光量がItaからItbに変化したときその吸光度の変化分 ΔA は $\Delta A = \text{Log}(Ita/Itb) = \text{Log}Ita - \text{Log}Itb$ を計算して求めることができる。

【0017】次に検査者は、吸光度の変化分と濃度の関係を示す物質Xの検量線を参照し、求めた ΔA に対応する濃度を求める。

【0018】ここで検量線は、上記採取した血液の代わりに、物質Xの濃度がそれぞれ異なり、それぞれの濃度が既知であるn種の血清すなわちn種の標準液について、上記と同様にして吸光度の変化分 $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3, \dots, \Delta A_n$ を求め、これにより吸光度の変化分と濃度との関係の回帰直線を作成すれば、図2のように求めることができる。

【0019】上記の例では、全血の透過光測定により求めた ΔA から直接に検量線を参照して物質Xの濃度を求めている。しかし、この検量線は血清の標準液に基づいて作成されたものである。そして、全血（赤血球を含んでいる）中の物質Xの濃度は、血清（赤血球を含んでいない）中の物質Xの濃度よりも薄い。このため上記 ΔA から直接に上記の検量線を参照して物質Xの濃度を求めるならば、実際の物質Xの濃度とは若干の誤差が生じる。そこで、この ΔA を補正して、血清中の物質Xの濃度に対応する値に変換し、この値を用いて上記検量線を参照し物質Xの濃度を求める。この補正は、予め測定して求めたヘマトクリット値HCTを用いる次の関係式により行う。

【0022】分量（容積比率）

界面活性剤1に対し全血試料が10～70

なお、安定化剤、緩衝液の添加量に関しては使用する全血試料の量に応じて適宜添加する。

【0023】界面活性剤1に対し全血試料が10以下であると、反応率が悪くなり、70以上では溶血作用が働かなくなる。また上記使用波長は、近赤外光の約800～1000nmであれば好適な結果が得られる。

【0024】ここで参考として図3に試料および測定条件の異なる場合の吸光度の時間的変化の例を示す。反応曲線1と2は試料に血漿を用いた場合の反応である。反応曲線3と4は試料に全血を用いた場合の反応である。反応曲線5と6は試料に全血と界面活性剤を用いた場合の反応である。測定はこれらの3種類の試料を用い、まず第1反応として 試料+緩衝液+安定化剤 で吸光度を測定し、吸光度が一定であることを確認した。反応曲線の1、3、5がそれである。すなわちいずれの試料で

も経時とともに反応が進んでいないことを示す。次に第2反応としてそれぞれの溶液にラテックス液を添加し、吸光度の変化を観察し、抗原抗体反応の有無を評価した。反応曲線の2、4、6がそれである。反応曲線2は、血漿を用いる従来行われていた方法による反応経過であり、経時的に吸光度が増加していることが分かる。反応曲線4は全血では反応が全く進んでいないことを示す。反応曲線6は全血に界面活性剤を加えたもので、経時的に吸光度が増加していることが分かる。そして、従来方法による反応曲線2と本発明の方法による反応曲線6とを比較すると、後者は前者より反応率は落ちるが、両者は近似していることが分かる。しかし、全血中のCRPの濃度は、血漿中のCRPよりも薄いため、別に測定したヘマトクリット値HCTを用い、前述の(1)式と同様の次式により補正するならば、反応曲線2の血漿を用いたときの吸光度の変化分 ΔAbs_2 と、反応曲線6の全血+界面活性剤を用いたときの吸光度の変化分 ΔAbs_6 は、ほぼ同じ値となる。

(補正後の ΔAbs_6) = (全血と界面活性剤を用いたときの ΔAbs_6) \times {100 / (100 - HCT)}

ここで、 $\Delta Abs_6 = 300\text{sec}$ の吸光度 - 0secの吸光度 である。

【0025】以上はCRP測定の例であるが、ラテックス液のラテックス粒子に結合させる抗原または抗体を代えるならば、同様に血液中のC反応性蛋白(C-Reactive Protein; 以下CRPと称する)、リウマチ因子(RF)、抗ストレプトリジンO(ASO)等も測定することができる。

【0026】次に、このような方法により上記物質Xの血液中濃度を測定する装置について説明する。図4にその全体構成を示す。

【0027】光源11の光は、ヘモグロビン等に対して吸収が極めて少ない波長の光を発生し、この光は試料セル12に照射されるように設定されている。試料セル12は、透明の部材で作成されており、この試料セル12を透過した光は、検出器15で電気信号に変換される。この検出器15の出力はA/D変換器16に至り、ここでデジタル値に変換され、マイクロコンピュータ17に至るようにされている。

【0028】試料・界面活性剤注入器8は、試料である血液、界面活性剤をそれぞれ収容し、マイクロコンピュータ17の指示があれば、その指示に応じて選択した液体を混合槽9に注入するものである。攪拌装置10は、マイクロコンピュータ17の指示に応じて、混合槽9に収容されている液体を攪拌する装置である。輸液装置19は、マイクロコンピュータ17の指示に応じて、混合槽9に収容されている液体を試料セル12に供給する装置である。試薬注入器13は、試薬である、安定化剤、緩衝液および物質Xに対して抗原抗体反応を生じさせる感作ラテックス液をそれぞれ収容し、マイクロコンピュータ17の指示があれば、その指示に応じて選択した液体を試料セル12に注入するものである。攪拌装置14は、マイクロコンピュータ17の指示に応じて、試料セル12に収容されている液体を攪拌する装置である。プリンタ18は、マイクロコンピュータ17から出力されたデータを印刷するものである。マイクロコンピュータ17は、演算、制御を行う中央処理装置(以下CPUと称する)、ROMおよびRAMからなる主メモリ、外部とのデータの授受を行うためのインターフェイス、キーボード等の入力装置からなり、本装置の各部を制御すると共にA/D変換器16からのデータを処理する。CPUの動作のフローチャートを図5に示す。

【0029】図5を参照して、本装置の動作を説明する。CPUは試料・界面活性剤注入器8に対し、血液と界面活性剤を混合槽9に注入するように指示する(ステップ100)。これにより試料・界面活性剤注入器8は血液と界面活性剤を混合槽9に注入する。次にCPUは、攪拌装置10に対して、攪拌を指示する(ステップ101)。これにより攪拌装置10は混合槽9の液体を所定時間 t_2 攪拌する。次にCPUは、輸液装置19に対して所定量の液体を混合槽9から試料セル12に移送するように指示する(ステップ102)。これにより、輸液装置19は所定量の液体を混合槽9から試料セル12に移送する。

【0030】次にCPUは、試薬注入器13に対し、安定化剤と緩衝液を試料セル12に注入するように指示する(ステップ103)。これにより試薬注入器13は安定化剤と緩衝液を試料セル12に注入する。次にCPUは、攪拌装置14に対して、攪拌を指示する(ステップ104)。これにより攪拌装置14は試料セル12の液体を所定時間 t_2 攪拌する。次にCPUは、光源11を発光させ、そのときのA/D変換器16からのデータにより吸光度が所定値で安定しているか否かを確認し(ステップ105)、所定値で安定していると判断すればステップ106に進む。ここで、CPUは所定値で安定していないと判断すれば、ステップ111に進み、プリンタ18にその旨を出力し、エンドとなる。

【0031】CPUは、ステップ106において、試薬注入器13に対し、上記ラテックス液を試料セル12に注入するように指示する。これにより試薬注入器13はラテックス液を試料セル12に注入する。次にCPUは、攪拌装置14に対して、攪拌を指示する(ステップ107)。これにより攪拌装置14は試料セル12の液体を所定時間 t_2 攪拌する。

【0032】次にCPUは、この攪拌後直ちに光源11を発光させ、さらにその時点より所定時間 t_3 後、光源11を発光させ、それぞれの時点のA/D変換器16からのデータに基づいて両時点の吸光度の差すなわち吸光度の変化分 ΔA を求める(ステップ108)。

【0033】次にCPUは、予め入力され主メモリに記

憶している物質Xの血中濃度と吸光度の変化分の対応テーブルを参照して、ステップ108で求めた ΔA に対応する物質Xの血中濃度を求める(ステップ109)。

【0034】次にCPUは、ステップ109で求めた濃度のデータ、ステップ108で求めた吸光度の変化分 ΔA のデータをプリンタ18に出力する(ステップ110)。プリンタ18はこれらのデータを印刷する。

【0035】上記の対応テーブルは、予め本装置を用い、上記試料の代わりに物質Xの濃度が異なり各濃度が既知である複数種の血清液それぞれについての吸光度の変化分 ΔA_1 、 ΔA_2 、 ΔA_3 …を求めるならば、これによって濃度-吸光度の変化分の回帰直線が求められるので、この直線から作成することができる。

【0036】この装置では、全血の透過光測定により ΔA を求め(ステップ108)、この ΔA から直接に検量線を参照して物質Xの濃度を求めている(ステップ109)が、ステップ108で ΔA を求めた後、この ΔA を、前述の(1)式により補正して、この補正後の ΔA から検量線を参照して物質Xの濃度を求めるようにしても良い。この補正に用いられるヘマトクリット値HCTは、別の測定により求め、マイクロコンピュータ17の主メモリに予め記憶させておくものである。このようにすればより正確に物質Xの濃度を求めることができる。

【0037】

【発明の効果】本発明の方法、装置によれば、血液中の

抗原抗体反応物質の濃度を測定する際、全血に直接試薬を注入して測定することができるので、血液を遠心分離する必要がない。このためこの種の物質の濃度を、迅速に測定することができる。更に血液成分測定と同じ処理をした検体を用いて測定ができるため手間がかからない。また本発明の方法によれば遠心分離器のない施設であっても測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明方法に用いられる分光光度計の構成を示す図。

【図2】本発明方法に用いられる検量線作成の説明図。

【図3】各種液体の吸光度の時間的变化を示す図。

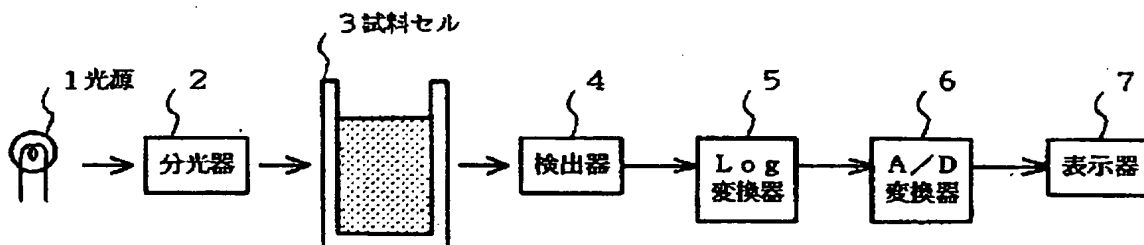
【図4】本発明装置の構成を示す図。

【図5】図4に示した装置の動作を説明するための図。

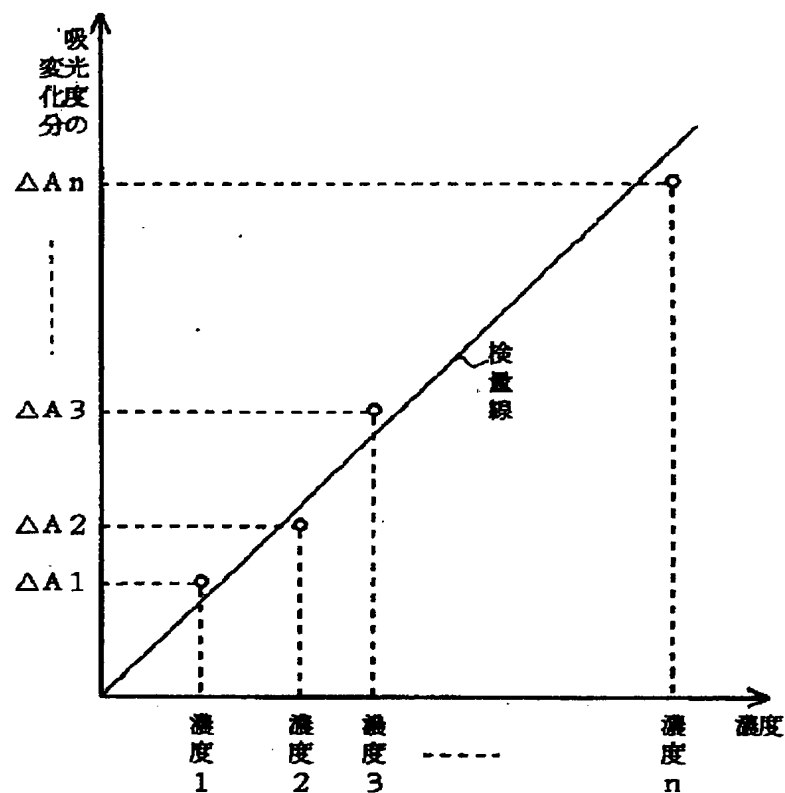
【符号の説明】

- 1、11 光源
- 3、12 試料セル
- 4、15 検出器
- 7 表示器
- 8 試料・界面活性剤注入器
- 9 混合槽
- 13 試薬注入器
- 17 マイクロコンピュータ
- 19 輸液装置

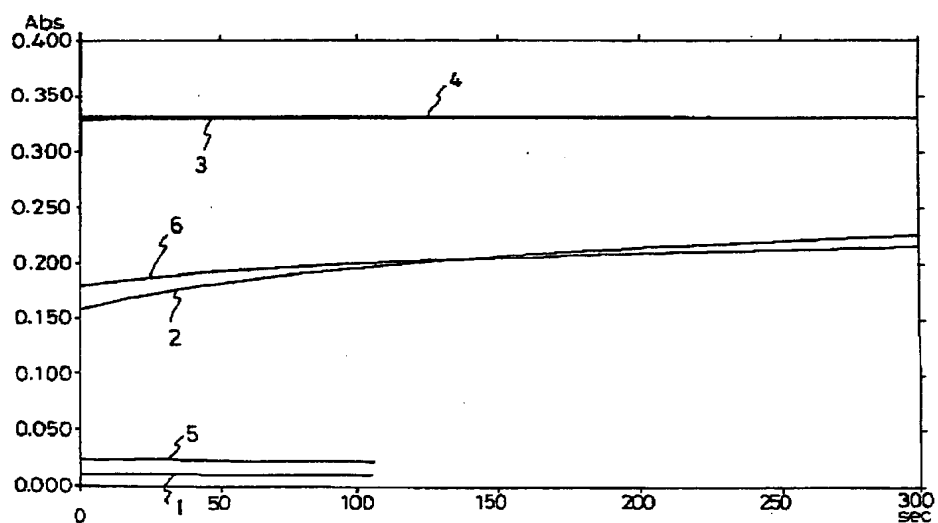
【図1】



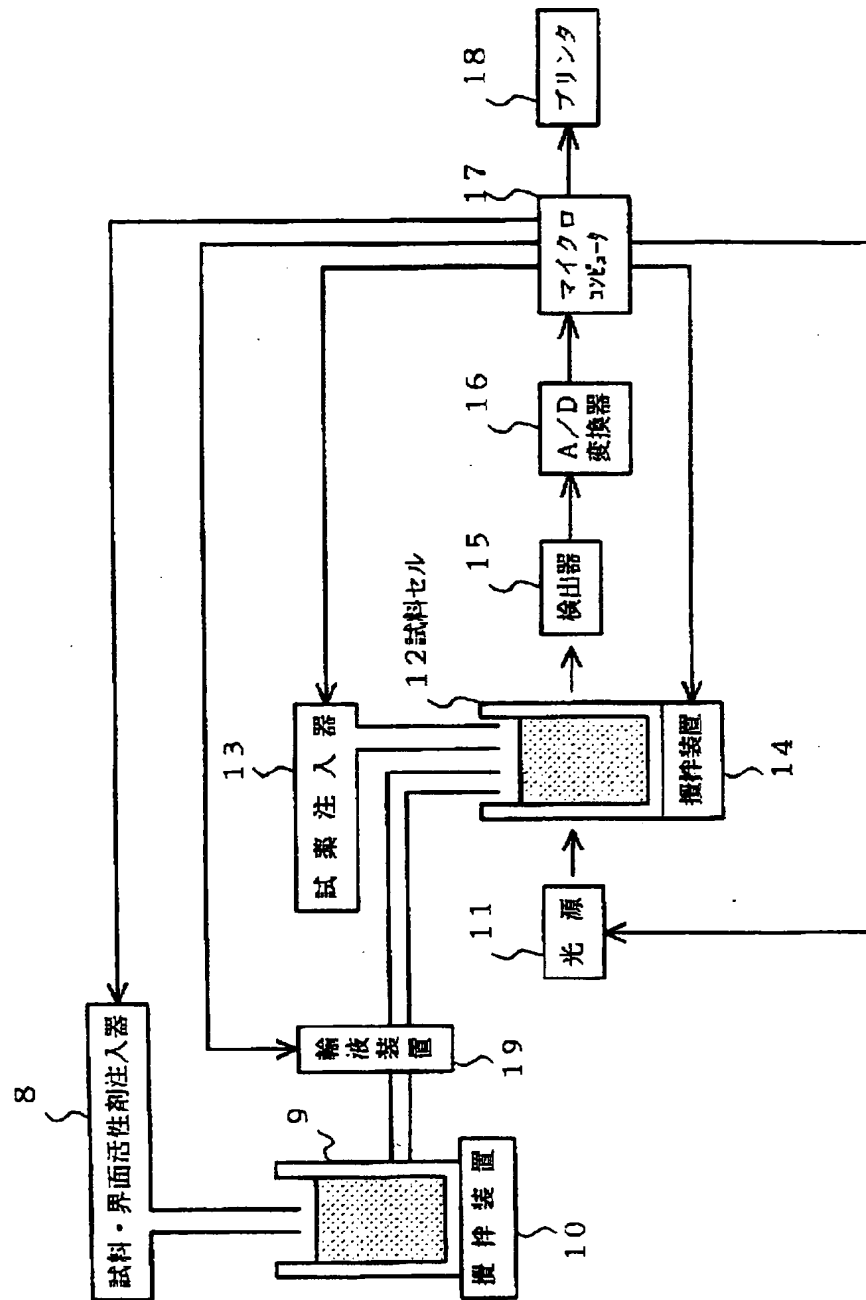
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

